



2/9/1 (Item 1 from file: 351) Links

Derwent WPI

(c) 2005 Thomson Derwent. All rights reserved.

011604833

WPI Acc No: 1998-021961/199803

XRAM Acc No: C98-008175

A new polypeptide and an antibacterial agent containing it -
used as antifungal agents when sapecin can not be used

Patent Assignee: AMANO PHARM KK (AMAN)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 8143596	A	19960604	JP 94305509	A	19941114	199803 B

Priority Applications (No Type Date): JP 94305509 A 19941114

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

JP 8143596 A 8 C07K-014/435

Abstract (Basic): JP 8143596 A

A polypeptide which shows amphipathic properties and has an amino acid sequence containing basic amino acids or its salt, is new. Also claimed are: (1) a polypeptide having the amino acid sequence: A-B-B-C-B-B-A-C-B-B-C (A = basic amino acid, B = hydrophobic amino acid not precluded from alpha -helix structure, C = hydrophilic amino acid not precluded from alpha -helix structure) or its salt; (2) a polypeptide with the sequence (I), or its salt:
His-Leu-Ala-Gln-Ala-Ala-His-Gln-Leu-Leu-Arg (I); and (3) an antibacterial agent containing the above polypeptide or its salt as the active component.

ADVANTAGE - The new polypeptide can be used as an antifungus agent in the field where sapecin could not be used.

Dwg.0/5

Title Terms: NEW; POLYPEPTIDE; ANTIBACTERIAL; AGENT; CONTAIN; ANTIFUNGAL; AGENT; CAN

Derwent Class: B04; C03

International Patent Class (Main): C07K-014/435

International Patent Class (Additional): A01N-037/18; A61K-035/64; A61K-038/00; C07K-007/06

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-C01C; C04-C01C; B04-N03; C04-N03; B14-A01; C14-A01

Chemical Fragment Codes (M1):

01 F014 F521 H1 H100 H181 J0 J011 J012 J1 J171 J3 J371 K0 L2 L250 M280
M312 M313 M314 M321 M331 M332 M340 M342 M343 M349 M371 M381 M391
M423 M510 M520 M521 M530 M540 M620 M630 M640 M650 M710 M903 M904
P241 Q233 V902 V913 V921 9803-08701-N

Generic Compound Numbers: 9803-08701-N

(1)日本国特許庁 (J.P.)

(2)公開特許公報 (A)

(3)特許出願公報登録

特開平8-143596

(4)公開日 平成8年(1996)6月4日

(5)出願人
C07K 41/15
A01N 37/18
A61K 35/04
38/00
ZNA
333-4H
2
763-1C
ADZ

A61K 37/02 ADZ

審査請求未請求 請求項の数4 FD (全5頁) 記載頁に渡る

(21)出願番号 030216162

(22)出願日 平成8年(1996)11月14日

(21)出願番号 030216162

天野製薬株式会社

東京都台東区市谷北1丁目2番7号

(22)代理人 小林田 一郎

東京都江戸川区千住2丁目22番 天野製薬株式会社

(23)発明者 名取 俊一

東京都北区鷺宮4丁目22番-19

(24)発明者 木村 元

東京都下京區寺子屋六丁目上331

(6)【発明の名前】兼尾アリペプチド及びそれを構成成分とする複合物

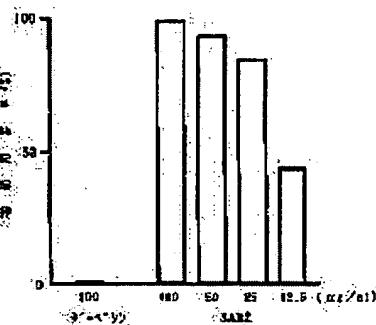
(7)【要約】

【目的】新規な兼尾性アリペプチドを提供する。

【発明】同発明性を示し、両目つ瘡性アミノ酸を含むアミノ酸配列を有する新規アリペプチドまたはその類であり、より具体的には、次の式で示されるアミノ酸配列を有する新規アリペプチドまたはその類。

A-B-C-B-B-A-C-B-B-C

(但し、Aは非極性アミノ酸を示し、Bはイレリック酸を含まない疎水性アミノ酸を示し、Cはα-ヘリックス構造を妨げない疎水性アミノ酸を示す。) 本発明の新規アリペプチドは、抗瘡剤として利用が可能である。

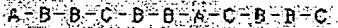


BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】両親活性を示し、而且つ癌活性アミノ酸を含むアミノ酸配列を有する新規ポリペプチドまたはその塩。

【請求項2】次の式で示されるアミノ酸配列を有する新規ポリペプチドまたはその塩。



(但し、Aは性活性アミノ酸を示し、Bはオヘリックス結合を有しない親活性アミノ酸を示し、Cはオヘリックス結合を有しない親活性アミノ酸を示す。)

【請求項3】百万目、1で示される新規ポリペプチドまたはその塩。

【請求項4】請求項3乃至請求項3記載の新規ポリペプチドまたはその塩を有する成分として含有してなる組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【在庫の利用分野】本発明は、センチニクペプチド (Centikukupetptide)、均勻体蛋白中に試験される抗腫瘍性ポリペプチドであるアーベシン (Averasin) のアミノ酸配列、その部位特異的変異法をもつてて在庫を改変することにより得られたアミノ酸配列を有する新規な抗腫瘍性ポリペプチドに関する。この新規な抗腫瘍性ポリペプチドは抗腫瘍剤として利用が可能である。

【0002】

【従来の技術】癌腫や癌性の血管を、昆虫に特徴したリニンに活性をもつけるといった特徴をもつてて癌活性蛋白が試験されることが相次いでいる。これらの特徴は、抗体活性を有しない既存の生体防護剤にとって、重要な価値があるものと考えられる。

【0003】これらのうちで、例えばセンチニクペプチドは在庫中に試験される蛋白蛋白として、直接腫瘍作用をもつてて (J. Biol. Chem., 255巻, 2919-2924号 (1980年))、抗腫瘍活性を持つ蛋白 (Biotin, J., 22巻, 727-734号 (1983)) などが開発されている。

【0004】前記のレクチン結合蛋白は、サルコファーベー (Sarcophaga) レクチンと命名され、アフリカのサルコファーベーの貝田根鉢を培養させる、ヒトT細胞よりのイーンクーフェロンの産生を抑へて生体防護剤の作用が研究されている。

【0005】また後者の抗腫瘍活性を持つ蛋白としては、例えばサルコトキシン (Sarcotoxin) 1と命名されてその理化学的性質も明らかにされている (特開昭59-137301)。蛋白、サレコトキシン1!と命名されてその理化学的性質も明らかにされている (特開昭62-35599)。蛋白、および同様にセンチニクペプチドの生体防護剤として開発されている (特開昭63-139997)。蛋白等が効いてい。

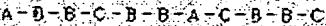
【0006】

【当明が解決しようとする課題】アーベシンは化粧のアミノ酸からなる新規ポリペプチドで、グラム陽性細菌に對し極めて強烈な活性を有している。しかしながら、抗腫瘍活性を有しない蛋白質ならぬり、これらは必ずしも蛋白質の活性化が含まれていないと同時に、抗腫瘍活性部位の活性など、詳細な活性が必要とされていた。

【0007】即ち、これまでにアーベシンなどの抗腫瘍性ポリペプチドの活性の発現に必要とされるアミノ酸配列については詳細に掲げられたことはなく、また明さばは部位活性の活性をもつてこれらを同定することに成功した。さらに本発明は、本体のアーベシンが持たない、抗腫瘍力を備えた新規な抗腫瘍性ポリペプチドを提供するものである。

【0008】

【発明を解決するための手段】本発明は抗腫瘍性を示し、尚且つ癌活性アミノ酸を含むアミノ酸配列を有する新規ポリペプチドまたはその構造にこれを有する蛋白質とする抗腫瘍剤を提供する。又に本発明は、次の式で示されるアミノ酸配列を有する新規ポリペプチドまたはその構造にこれを有する抗腫瘍剤に関する。



【0009】上記アミノ酸配列において、Aは性活性アミノ酸であり、具体的には、Aはオヘリックス結合を有しない親活性アミノ酸であり、より具体的には、Thr, Pro, Gluを除く親活性アミノ酸を示す。又にCはオヘリックス結合を有しない親活性アミノ酸であり、より具体的には、Asn, Gluを除く親活性アミノ酸を示す。又本発明のポリペプチドは上記のアミノ酸配列のN末端及びC末端にアミノ酸を付加されていても良い。

【0010】本発明において、アミノ酸は、以下のように略号で示される。

Asn: アスパラギン Asp: アスパラギン酸, Ala: アラニン, Arg: アルギニン, Thr: オヘリックス結合, Glu: グリシン, Cys: グルタミン, Gln: グルアミン, Ser: セリン, Tyr: チロシン, Thr: フレオニン, His: ヒスチジン, Leu: リオジン, Pro: プロリノン, Ivs: リシン, [0011] 本発明で提供されるより具体的なポリペプチドとしては、ヒスチジン (His) をN末端とい、C末端のアミノ酸から成され、カルボキシル末端がリシン (Lys) であるポリペプチドが挙げられる。

【0012】また、本発明のポリペプチドは、他の形を取ることができる。例えば、トリフルオロ酢酸、メタノスルホン酸、塩酸、硫酸等の有機酸または無機酸の付加物が含まれる。

【0013】本発明のポリペプチドは、ペプチド合意に適用される組成などと、容易に合成することが可能である。例えば、メリフィールド法の方法 (Journal of Biomaterials, 5卷, 205-214号 (1983)) に従じて合成することが可能である。また、市販のペプチドシ

ンセナイザなどによっても合成することができます。更に本発明のオリベブチドのアミン誘導剤をコートする被覆干を用いることで、電子工学的手法を用いて大量に生産することが可能である。

【0014】得られた組合せオリベブチドは、ケルダ、更に過酸HPLC、イオン交換カラムなど、通常の蛋白質・ペプチドの検査に用いられる手段により高精度に精査することができる。

【0015】本発明のオリベブチドは、目的に対して他の組成物として抗菌剤として利用できる。即ち、それ单独でまたは適当な担体などと組合せた形態で抗菌剤として利用できる。又に、他の抗菌剤を組合せて用いることもできる。

【0016】例えば、医療、食品、農林のみならず、コンタクトレンズの洗浄液、軟膏剤、石鹼、シャンプー、ペーティフード、歯磨ペーストなどの防腐剤および消毒剤として使用することもできる。

【0017】医療としての使用としては例えば、細菌性疾患に対する治療および予防用の薬剤として用いることができる。Cの場合は、供給の包装、並びに応じて本発明の抗菌オリベブチドが包装を有する限り仕事の段階方法および段階が選択できる。

【0018】例えば、粉末、顆粒、安瓿、錠剤、散剤、トローチ剤、カプセル剤、塗剤、坐剤、注射剤等の医薬組成物として、ピトニ替わり的又は非替わり的で安全に供給することができる。これらは、医療上許容される既存剤を配合して構成される。

【0019】供給剤としてはシロップ、アラビアゴム、ゼラチン、ソルビトール、トラガントゴム、ポリビニルピロリドン、ラクトース、ゼラチン、とうもろこし澱粉、蜂蜜カルシウム、ソルビトール、グリシン、ステアリン酸マグネシウム、タルク、オリエチレングリコール、シリカ、馬鈴薯澱粉、オトリイムラクルナルフルート、オリビニルアルコール、ステアリン酸カルシウム、二酸化チタン、オリーブ油、ビーガク油、ゴマ油などとの植物油、パラフィン油、中链脂肪酸油、エタノール、プロピレングリコール、生理食塩水、滅菌水、グリセリン等の他の着色剤、調味料、遮光剤、安瓿剤、栓塞剤などはよりその医療上許容されるものであれば使用できる。塗剤、軟膏剤は各自公知の方法によってフィルムコーティングすることもできる。

【0020】本発明の抗菌剤は、本発明のオリベブチドを0.1%～1.0%重量%、軽くましくは0.005～6.0%重量%含むことができる。

【0021】又に本発明のオリベブチドについて詳述する。本発明者はガーベシンについて既存研究の結果、ガーベシンの活性の発現に必要とされるアミン誘導剤を部位特異的変異法をもちて固定することに成功した。

【0022】又に、本発明者は活性中心となるアミノ-

酸を過酸化したオリベブチドが、本来のガーベシンが抗酸活性を失却しない目的に対して抗酸力を示すことを見い出し、本発明を完成した。

【0023】ガーベシンとは、既往アミン酸に亘る抗酸性オリベブチド「The Journal of Biological Chemistry, 261卷, 1712頁 (1986)」にて、その一次構造は、配列番号2に示される。

【0024】このガーベシンは、セントニクバエの幼虫体液から得られ、既に、ガーベシン(Sapatin)をコートする被覆子を帝王蝶生物である触角に組み込んで抗酸化し、該触角を若齢することによってガーベシンを大量に製造する方法(特開平4-33583)も知られている。

【0025】本発明者は、ガーベシンのアミン誘導剤(配列番号1)において、3位、16位、20位、30位、31位及び6位の6つのシスティン残基は、3位のジペルブリド結合を形成していることが明らかとなっている。

【Journal of Biochemistry, 127卷, 314頁 (1990)】ことより、このジペルブリド結合と、塩基性アミン誘導剤ガーベシンの活性の発現に必要であろうと予想し、これらについて詳細な検討を行った。

【0026】そこでまず、これらのジペルブリド結合を酸性アミン誘導剤を発現的に化学修飾して、活性への影響を調べることにした。

【0027】以下、実験及び実施例を示しながら本発明を詳述する。尚、本発明はこれらにより規定されるものではない。

【0028】実験例1 ガーベシンの化学修飾
ガーベシンのジペルブリド結合と塩基性アミン誘導剤(アレギニン、リシン、ヒスチジン)をそれぞれ定量的に純粋化して、活性への影響をみた。

【0029】① ジペルブリド結合の解離
ガーベシンのジペルブリド結合を開裂するため、10μgのガーベシンを20mM DTT浴液(0.14M Tris・塩酸緩衝液(1mM))に5分に溶解し、抗酸活性を以下のようにして50%に。

【0030】成育したスクロロコリカバ(Actinomyces (Sphaerotilus) sphaericus) 40209株をantibiotic red (1M) (以下、M3という) プレート培地(Difco製) 10mlに接種し、37°Cで6h、=0.3にならまで振盪培養した。

【0031】培養液、遠心分離(8000×g、15分)により菌体を回収して昆布液(10mM L-胱アミド)に100μgに溶解し、が活性に0.3となるよう溶解した。この昆布液0.0016～0.16mMのM3菌体培地と上記のガーベシン(各濃度0.31と0.2%BSAを含む)を絶対濃度0.01Mが活性をもつて固定して、37°Cで3時間振盪培養した。培養後、試験管を水中で1時間冷却後、培養液の0.1mlを測定した。ガーベシン浴液の代わりに、20mM DTT浴液(0.14M Tris・塩酸緩衝液) pH7.

2.)]と0.5mMスルホキ酸の合計液の1/10の量を2%PVP-
一水として、下記式によりスクワロコラクス・アリ
レクスFD400円錐の活性を算出した。

【003-2】活性 = (ナーベン合計液に対する%)
... / (コントロールの%) × 100

【003-3】その結果を図2に示した。ジスルフィド結合を形成することにより、ナーベンの活性は増強した。

【003-4】④ Hs残基の活性

Hs残基を抱合するために、ナーベン10μgを溶解液
【500mM HEPES (pH7.5) / 200mMアラヒドノ酸
NaB(OH)2】0.5mLに溶解して25℃90分インキュベー
トした後、インキュベート後、修飾ナーベンの抗酸活性
をのと同様にして測定した。

【003-5】その結果を図2に示した。Hs残基の修飾
によりナーベンの抗酸活性は減少した。

【003-6】⑤ Hs残基の活性

Hs残基の修飾はペプチドアキシニミダーゼ
(以下、PDIという) を用いて行った。ナーベン10
μgを20mM CoCl2溶解 [0.1M Tris-酢酸緩衝液 (pH
2.1)] 0.5mLに溶解して、ついでPDI 0.6ニットを加え
55℃で30分間インキュベートした。インキュベート後、
修飾ナーベンの抗酸活性をのと同様に測定した。

【003-7】その結果を図3に示した。Ar残基の修飾
によりナーベンの抗酸活性は減少した。

【003-8】⑥ Hs残基の活性

Hs残基を抱合するために、ナーベン10μgを溶解液

#1 5'-CCGCTTCCGCGATTTCCTG-3'
#2 5'-TCCGCTTCTGCTCCCAT-3'
#3 5'-CCGATATCGCTTCGACAG-3'
#4 5'-CATTCCTGTTGGCAAGAACTCCCTCC-3'
#5 5'-TCGACGAAATCTCGATCTTCAATG-3'
#6 5'-GCTATTCGATTCGGCGCTCTCTCCAT-3'
#7 5'-CCGCTCGCTATGTCGCAATTAACAAATC-3'
#8 5'-ACTCGCGATCAATCCCGCTTCTGCT-3'
#9 5'-GCTTCGCTCGCGCTTCGCTGTTG-3'

【004-4】実験3) 実験ナーベンの活性測定

ウエスタンブロットはからの計算で、実験2)で用いられ
た各種アミノ酸修飾ナーベン及びナーベンがほぼ等量になる
ように、実験1)で用いた抗酸活性の測定法と同じモ
の抗酸力を調べた。その結果を、表3)に示した。活性の

* [50mMリバクタミン (pH7) / 0.5mM DEPC] 0.5mM硫酸
200℃で10分間インキュベートした。インキュベート後、修飾ナーベンの抗酸活性をのと同様に測定した。

【004-1】その結果を図4に示した。Hs残基の修飾
によりナーベンの抗酸活性は減少した。

【004-2】以上のからの結果の実験により、ナーベン
の抗酸活性の各段には、ジスルフィド結合と2種の修
飾アミノ酸残基が重要なことがあることがわかった。

【004-3】実験4) ナーベン活性部位の具体的な操作

ナーベンの3種のジスルフィド結合と6種の修飾ア
ミノ酸のうち、どのジスルフィド結合かにどの修飾ア
ミノ酸残基が、活性の発現に必要であるかを明らかに
するために、部位特異的変性法を用いて各部位のナーベ
ンを作製し、これらの活性をよりナーベンの活性
発現に必要なアミノ酸残基の同定を試みた。

【004-4】各部位のナーベン活性部位の作製
は、すでに明らかになっているナーベン粗粒子 [The
Journal of Biological Chemistry, 263卷, 1711号 (19
88)] を用いた群による組み換えナーベンの発現系
(特開平4-31583) と、アマニシム社のSculptorイン
ピトロミスタークリオシスキットを用いて行なった。空
白の導入に用いたプライマーの配列及び導入されたア
ミノ酸変換を下記に示す。尚、上記の各部位のナーベン
の発現は、ウエスタンブロット法で確認した。

【004-5】

Cys 3 → Gln
Cys 16 → Gln
Cys 20 → Gln
Arg 23 → Gln
Arg 26 → Gln
Lys 33 → Gln
Arg 39 → Gln
His 23 → Gln
His 29 → Gln

後者は3段階 (+ + + 394, + + 394, + + +) 非常に弱
い) で評価した。

【004-6】

変異体番号	変換部位	活性
#1	Cys 3 → Glu	+
#2	Cys 16 → Glu	+
#3	Cys 20 → Glu	+
#4	Arg 23 → Glu	+
#5	Arg 26 → Glu	+
#6	Lys 33 → Glu	++
#7	Arg 35 → Glu	++
#8	Asp 48 → Glu	+
#9	Asp 10 → Glu	-
#10	チオタイフタア	++

【0046】その結果、3つのジスルフィド結合は、いずれの場合も、主な由来アミノ酸のうちArg 26, Arg 35, His 13, His 19が活性の発現に貢献であることがわかった。又、図は#4では活性の減少はさほど大きくなかったので、Arg 26は前述の4つのアミノ酸より活性発現に寄与していないものと思われる。

【0047】近年、ザーベンのNMR研究所が報告されており、*Aspergillus*の報告「EBC letters, 269号、カナダ (1990)」によれば、Arg 23とArg 35は活性部位リジン側鎖カルボキシル基に結合する部位をとっていると考えられる。ザーベンの黄色アフロ球菌への活性実験はカルボキシル基への結合を示しているとされているので、Arg 23とArg 35をCysで交換した変異体#4と#7で活性が消失したのは、これらの変異体がカルボキシル基に結合できなくなったためと考えられる。

【0048】一方、His 13とHis 19を含む#11から#14の4種の組み合はコンピューター解析で両親活性のうちヘリックス形成とすると予測された。

【0049】いくつかのザーベン以外の抗菌タンパクの抗菌活性は、このような正電荷を持った両親活性ヘリックスが抗菌作用を及ぼす複数個にチャンネルを形成するか、あるいは界面活性剤の作用で膜構造を破壊するために引き起こされると考えられている。

【0050】したがって、変異体#8と#9で活性が消失したのは、活性の条件を担う両親活性ヘリックスの正電荷が失われ、チャンネル形成能あるいは界面活性能が失われたためと考えられる。

【0051】実験例！ 既掲載の抗菌性ポリペプチド、ザーベンの活性条件が#11からGly 24の両親活性の40%ヘリックス構造に司どられていくと推定されるので、本

*この部分だけを合成して、新しいタイプの抗菌タンパクとして利用できないかと考えた。

【0052】よって、この構造の配列をもとに、より安定なヘリックスを形成できるよう一部のアミノ酸配列を代えて、配列番号「1」に記載のアミノ酸配列をもつポリペプチド(以下、SA)という)を合成した。

【0053】実験例2 SAの活性評価

SAの活性評価を以下のようにして行った。即ち、SA

20 10 µg/mlの濃度で、*Candida albicans*を含む酵母液(1:100倍)の方法(「The Journal of Biological Chemistry」, 260号, 32055頁(1985))に従って加え、その他他のへの影響を調べた。その結果を図1に示す。

【0054】図より明らかなように活性は少なくとも1.25 µg/ml以上の濃度で*Candida albicans*の活性を抑える抗真菌活性を有することをわかった。ザーベンは抗真菌活性を有しないことが明らかで、この研究はザーベンとは異なった活性をもつ強力な抗真菌性ポリペプチドである。

【0055】

【実験的結果】 本発明により得られる新規なポリペプチドは、これまでザーベンが適用できなかった抗真菌剤としての応用が可能であり、更にザーベンよりも低分子であることより、医薬品と使用する場合の安全性の面より有利である。

【0056】

【目次】

【実験例】

(6)

昭和38-143596

ペシソの抗固活性を比較する図である。図中で左は修飾されたザーベンソの結果を示し、右はザーベンソの結果を示す。

【図2】ザーベンソといふを修飾したザーベンソの抗固活性を比較する図である。図中で左は修飾されたザーベンソの結果を示し、右はザーベンソの結果を示す。

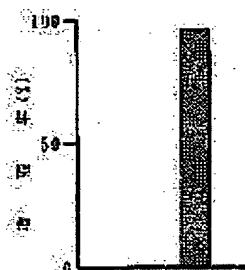
【図3】ザーベンソのAmを修飾したザーベンソの抗固

*活性を比較する図である。図中で左は修飾されたザーベンソの結果を示し、右はザーベンソの結果を示す。

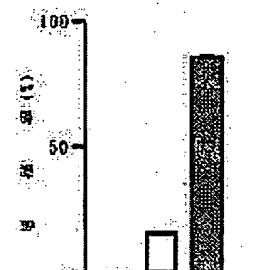
【図4】ザーベンソのAmを修飾したザーベンソの抗固活性を比較する図である。図中で左は修飾されたザーベンソの結果を示し、右はザーベンソの結果を示す。

【図5】SAB2のCeratobacter albitexに対する抗固活性とザーベンソの抗固活性の比較を示す図である。

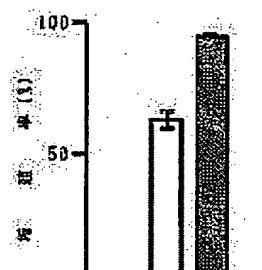
【図1】



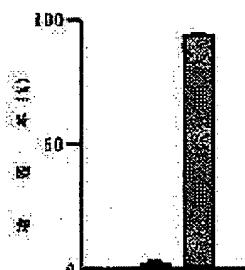
【図2】



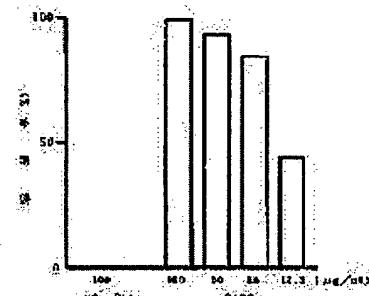
【図3】



【図4】



【図5】



【手帳補正】

【提出日】平成7年1月10日
 【手帳補正】
 【補正対象菌名】明義菌
 【補正対象項目名】(0.45)
 【補正方法】実測

【補正内容】

(0045)
 (実)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.